

8. Hermann Ph., Fredericq E. The role of the AT pairs in the acid denaturation of DNA // Nucl. Acids Res.— 1977.— 4, N 8.— P. 2939—2947.
9. Dore E., Frontali C., Gratton E. The role of ions in the acid melting of DNA // Biopolymers.— 1972.— 11, N 10.— P. 2033—2041.
10. Микельсон А. Химия нуклеозидов и нуклеотидов.— М.: Мир, 1966.— 667 с.
11. Изучение взаимодействия ДНК с протонами среды методом буферной емкости; Б. И. Сухоруков, М. М. Монтрель, В. К. Опанасенко, Е. К. Золотарева // Молекуляр. биология.— 1983.— 17, № 5.— С. 1009—1018.

Ин-т радиофизики и электроники АН Украины,
Харьков

Получено 22.07.91

УДК 543.42

Е. Д. Радченко, И. Д. Рева, А. М. Плохотниченко,
С. Г. Степаньян, Г. Г. Шеина, Ю. П. Благой

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ ГЛИЦИНА МЕТОДОМ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ В КРИОМАТРИЦАХ

Получены высокоразрешенные ИК-спектры глицина и модельных соединений методом «матричной изоляции». Проведен эмпирический анализ спектров и показано, что при замораживании в матрицах аминокислоты переходят из цвиттерионной в молекулярную форму. Обнаружено, что в матрицах присутствует несколько конформаций, возбужденных при температуре испарения. «Расщепление» конформационно-чувствительных пиков свидетельствует о наличии в матрице по крайней мере трех конформеров глицина. Выполнено предварительное отнесение конформеров.

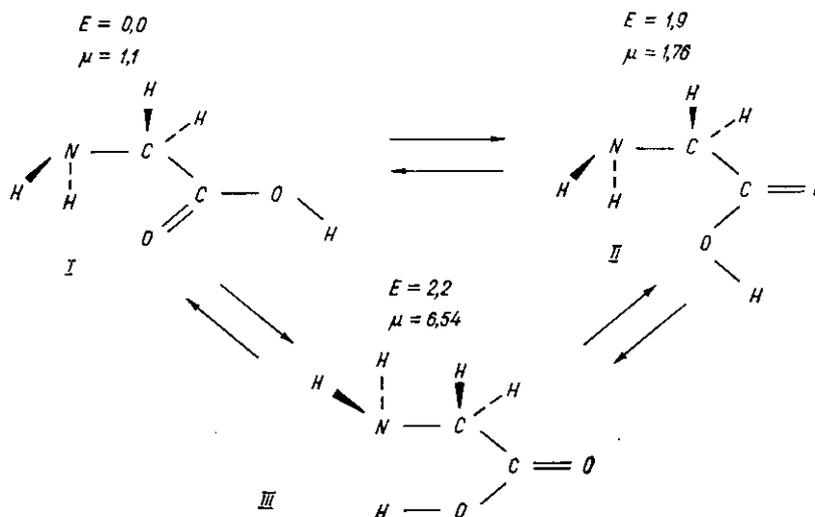
Введение. Задачи установления пространственного строения белков требуют знания структуры и конформационной динамики мономерных звеньев, включенных в полимерные цепи. Однако экспериментальное получение такой информации весьма затруднено, поскольку большинство аминокислот в кристаллах и растворах существует в виде цвиттерионов, молекулярная структура которых нехарактерна для полипептидных цепей. Кроме того, попытки получения необходимой информации на модельных соединениях в кристаллическом состоянии или в растворах наталкиваются на значительные искажения результатов вследствие сильного влияния эффектов окружения. Поэтому в настоящее время исследования наиболее выгодных с энергетической точки зрения конформеров аминокислот, их структуры и термодинамики взаимных переходов выполняются, в основном, расчетными методами квантовой химии в вакуумном приближении. Полученные таким путем структурные и энергетические параметры используются в дальнейшем для решения задач машинного моделирования более сложных полимерных систем.

Одно из первых теоретических исследований [1] подтвердило масс-спектрометрические измерения [2], из которых следовало, что аминокислоты в изолированном состоянии существуют в молекулярной форме. Это, в свою очередь, подсказало пути экспериментального решения проблемы конформационной динамики аминокислот — исследования структуры в газовой фазе. Впервые такие измерения были выполнены для простейшей аминокислоты — глицина в 1978 г. методом микроволновой радиоспектроскопии [3, 4]. Но дальнейший анализ [5, 6] ставит под сомнение выводы экспериментов [3, 4] о наблюдении наиболее стабильной структуры вследствие специфики экспериментальной методики.

Ab initio расчеты с оптимизацией геометрических параметров конформеров глицина [6] показывают, что в газофазных экспериментах могут реализоваться три равновесные молекулярные формы (E — отно-

© Е. Д. РАДЧЕНКО, И. Д. РЕВА, А. М. ПЛОХОТНИЧЕНКО, С. Г. СТЕПАНЬЯН,
Г. Г. ШЕЙНА, Ю. П. БЛАГОЙ, 1992

сительные энергии в ккал/моль; μ — дипольные моменты в дебаях, приведенные в работе [6]):



При этом существенный дипольный момент ($\mu = 6,54 D$) предсказан только у наименее стабильной конформации III. Остальные две, несмотря на их значительное содержание в равновесии, могут быть неактивны в микроволновой области спектра, поскольку обладают малым дипольным моментом.

Попытка внести ясность в вопрос о наиболее выгодной структуре молекулярного глицина была предпринята и методом ИК-спектроскопии в криоматрицах [7]. Однако отсутствие в то время надежного теоретического анализа и, по-видимому, недостаточное совершенство методики не позволили авторам окончательно разрешить противоречие эксперимент — теория.

Материалы и методы. Суть метода «матричной изоляции» [8] состоит в том, что на низкотемпературной подложке [$T = 8 \div 20 K$] из газовой фазы одновременно конденсируются исследуемое соединение и инертный газ (в наших экспериментах Ar, Kr). В такой замороженной матрице реализуется ряд уникальных условий, недоступных при использовании других методов:

— матрица прозрачна во всем диапазоне от дальней ИК-области до вакуумного ультрафиолета;

— в ней удается снизить до минимума взаимодействие исследуемых молекул как друг с другом, так и с окружением (из-за предельной инертности среды);

— как правило, в твердой матрице замораживаются равновесные состояния молекул, характерные для газовой фазы при температуре испарения;

— и главное: вследствие малости взаимодействия со средой и отсутствия вращательных переходов в инертных матрицах реализуется существенное сужение полос ($\delta\nu \approx 0,1 \text{ см}^{-1}$) в колебательных спектрах.

Очевидно, что в этих условиях удается наблюдать и идентифицировать наиболее тонкие структурные особенности молекул.

Криогенный модуль, разработанный авторами для матричных экспериментов, описан в работе [9].

Для реализации максимального разрешения и повышения фотометрической точности серийный спектрофотометр Specord IR-75 фирмы «Carl Zeiss» (Jena) был существенно модернизирован. Он помещен в специально разработанный герметичный кожух, продуваемый сухим азотом, что значительно снижает влияние водяных паров на спектры высокого разрешения. Механизм развертки волновых чисел снабжен шаговым двигателем, обеспечивающим дискретность $0,04 \text{ см}^{-1}/\text{шаг}$.

Аналоговый сигнал с дополнительного выхода спектрофотометра преобразуется в цифровой код 14-разрядным АЦП. Все процессы приготовления образцов, контроля и стабилизации параметров криогенного модуля, управления спектрометром и режимами регистрации спектрограмм

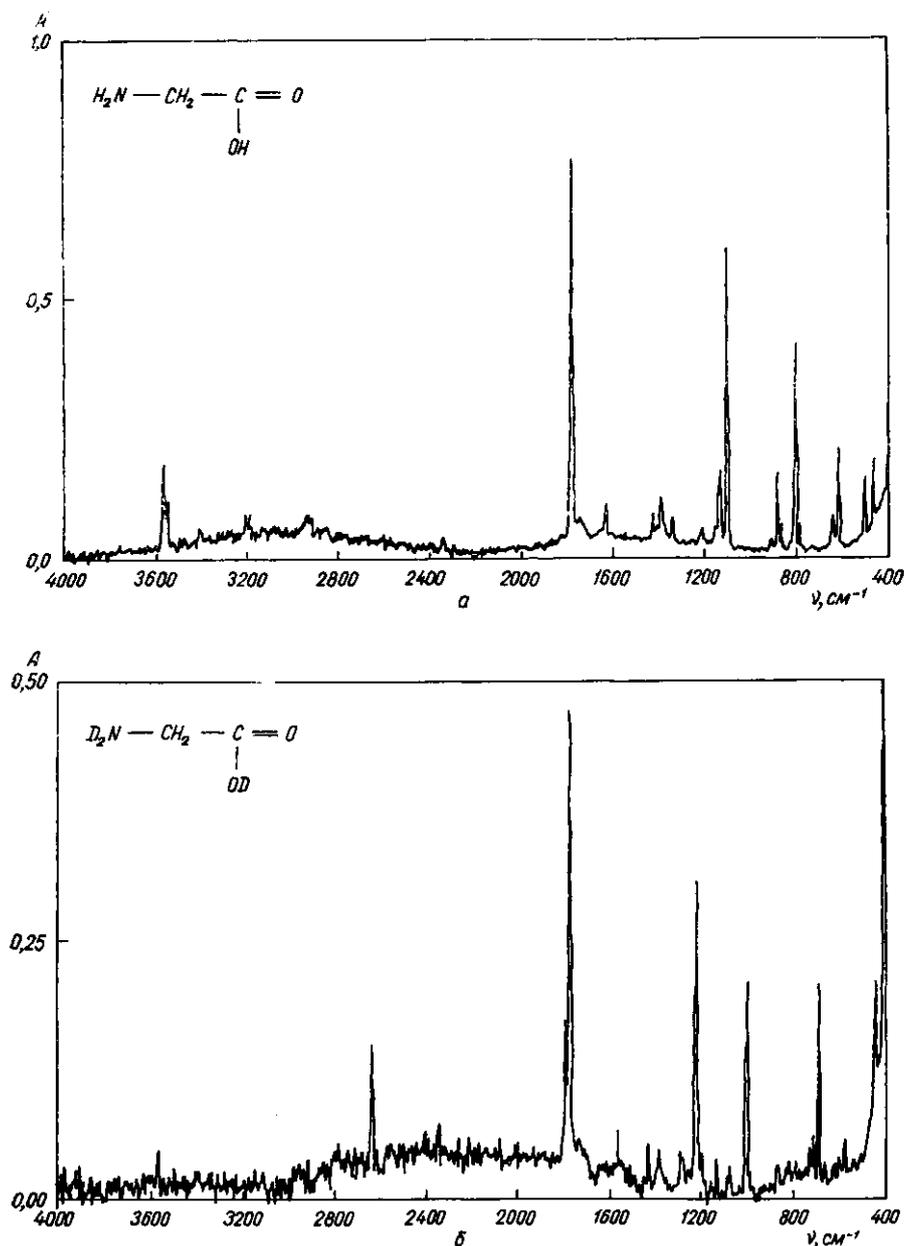


Рис. 1. Обзорные матричные ИК-спектры поглощения глицина (а) и дейтероглицина (б). Матричное отношение аргон / аминокислота равно 750

контролируются компьютером IBM-AT, связанным с экспериментальной установкой при помощи системы КАМАК. Такая компоновка прибора для регистрации ИК-спектров позволяет получить необходимое отношение сигнал/шум как путем экспонирования во времени в каждой точке развертки волновых чисел, так и при многократном сканировании заданного участка спектра.

Для каждого матричного образца первоначально производится запись обзорной спектрограммы с разрешением $\Delta\nu \approx 1,5 \text{ cm}^{-1}$, а затем отдельные наблюдаемые полосы регистрируются с предельным разре-

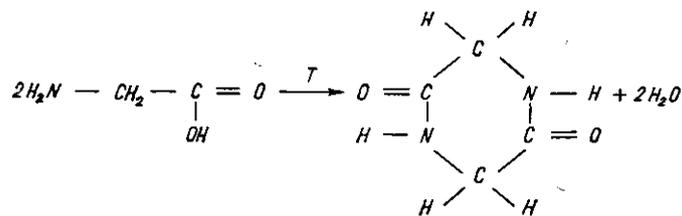
шением ($0,8 \text{ см}^{-1}$ при 1000 см^{-1}) путем многократного сканирования до получения заданного отношения сигнал/шум. Далее все спектры заносятся в память ЭВМ, таким образом формируется спектроскопическая база данных. Разработанное авторами программное обеспечение позволяет проводить обработку спектрограмм: сглаживание высокочастотных шумов, логарифмирование, разложение полос на гауссовы компоненты и вычисление их параметров (положение, полуширина, интегральная интенсивность и др.).

В работе использовали вещества: глицин — производства фирмы «Reanal» (Венгрия), N-метилглицин (саркозин) — фирмы «Fluka» (Швейцария), метиловый эфир глицина — фирмы «Serva» (ФРГ). Этиламин выделен по стандартной методике из бромистоводородной соли и доочищен путем трехкратной перегонки газа, предварительно закристаллизованного при температуре жидкого азота. Дейтерозамещенные производные глицина и модельных соединений получены перекристаллизацией из растворов в тяжелой воде.

Кристаллогидратная вода и адсорбированные газы удалялись из напыляемых веществ путем выдерживания при температурах несколько ниже температуры сублимации. Интервалы температуры сублимации образцов из ячейки Кнудсена соответственно составляли ($^{\circ}\text{C}$): для глицина — $130 \div 193$; метилового эфира глицина — 83 ; саркозина — $130 \div 150$; этиламина — $(-76) \div (-50)$; N, N, O-тридейтероглицина — $162 \div 177$. Для получения образца с минимальным рассеянием оптическую подложку в процессе кристаллизации матрицы поддерживали при 15 K . При спектрофотометрировании температуру образцов понижали до $10 \div 11 \text{ K}$. Соотношение компонент в образце строго контролировали по низкотемпературным кварцевым микровесам [9]. Скорость конденсации матричного газа, как правило, составляла $0,3 \text{ ммоль}/(\text{час} \times \text{см}^2)$. В зависимости от концентрации и количества вещества в матрице время приготовления образца варьировали от 50 до 500 мин.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены ИК-спектры глицина и дейтероглицина, полученные методом матричной изоляции в аргоне. Характерные частоты валентных колебаний ОН около 3562 см^{-1} , С=О (около 1779 см^{-1}), ОД (около 2629 см^{-1}) действительно свидетельствуют о том, что аминокислота в изолированном состоянии существует в молекулярной форме. В то же время ИК-спектр молекулярной формы глицина должен содержать два пика (симметричного ($\nu_{\text{сим}}$) и асимметричного ($\nu_{\text{асим}}$) валентных колебаний аминогруппы, которые, как видно из рис. 1, не проявились. Это обстоятельство побудило нас провести дополнительное исследование.

Можно было предположить, что при сублимации, так же как и в некоторых растворах [10], глицин димеризуется с образованием дикетопиперазина:



При этом наблюдаемое на рис. 1 число полос в области $3600 \div 3300 \text{ см}^{-1}$, на первый взгляд, подтверждает такой вывод с тем лишь сомнением, что частота 3562 см^{-1} слишком велика для $\nu(\text{NH})$ дикетопиперазина и в матричных образцах нет полос, отвечающих колебаниям H_2O . Для проверки этого предположения был измерен масс-спектр глицина с использованием техники полевой ионизации [11], адекватной условиям получения матричных образцов. Из рис. 2 видно, что в газовой фазе проявляется в основном мономер глицина ($M/e=75$) и отсутствует пик с массой дикетопиперазина ($M/e=114$). Зарегистри-

рован также слабый пик водородно-связанного димера глицина ($M/e=150$). Таким образом, предположение о реакции циклизации глицина при сублимации не подтверждается экспериментом.

Важная дополнительная информация была получена нами из матричного спектра модельного соединения — этиламина (рис. 3). Оказывается, что и в этилаmine ($C_2H_5-NH_2$) валентные колебания NH_2 -группы при обычных условиях приготовления матрицы (матричное

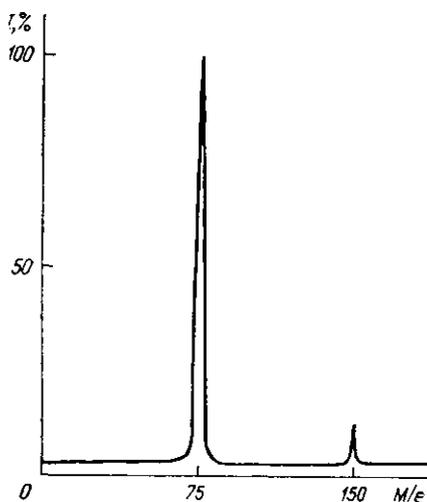


Рис. 2. Масс-спектр глицина

соотношение аргон/этиламин ~ 250) слабоактивны в ИК-спектре. Это же подтверждают и более ранние исследования метиламина как в газовой фазе [12], так и в матрицах [13, 14].

Полная ясность в этом вопросе возникла в результате теоретического анализа интенсивностей ИК-полос $\nu(NH_2)$ и $\nu(OH)$ в аминокислотах. Как известно, интенсивность ИК-поглощения определяется изменением дипольного момента молекулы в результате смещений атомов из положений равновесия при нормальных колебаниях. Для трех колебаний: $\nu(OH)$, $\nu(NH_2)_{сим}$, $\nu(NH_2)_{асим}$, используя полученные ранее [15] силовые постоянные, методом валентно-силового поля [16] были рассчитаны амплитуды смещений атомов из положения равновесия. Затем в приближении MNDO рас-

считана электронная структура и дипольные моменты равновесной и искаженных при нормальных колебаниях структур глицина. Результаты расчетов показывают, что в ИК-спектрах глицина ожидаемая активность валентных колебаний NH_2 -группы значительно ниже, чем у OH -группы:

Тип колебания	Частота, cm^{-1}	$\Delta\mu, D$
$\nu(OH)$	3 570	2,06
$\nu(NH_2)_{асим}$	3 432	0,09
$\nu(NH_2)_{сим}$	3 364	0,03

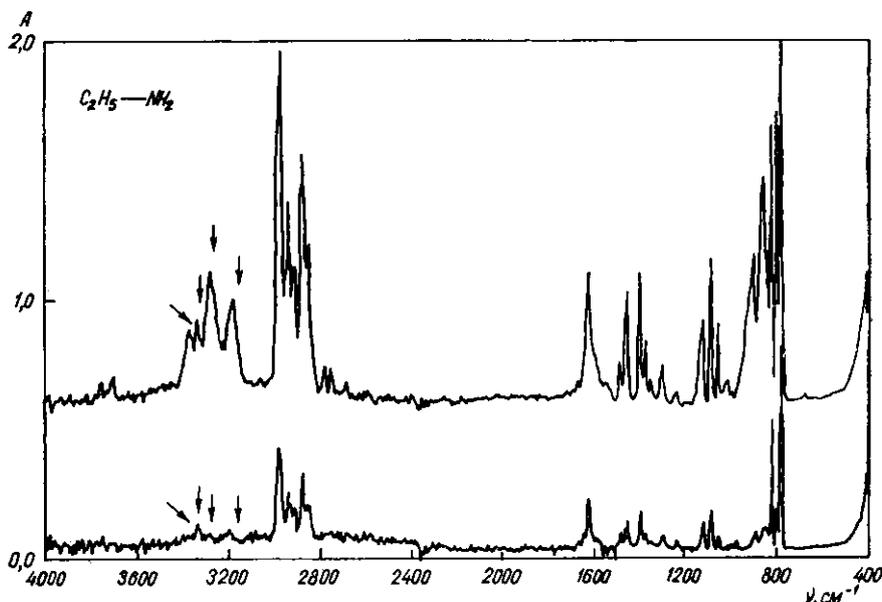


Рис. 3. Матричный ИК-спектр поглощения этиламина. Матричное отношение аргон/этиламин: верху — 50, внизу — 250. Стрелками отмечена область частот валентных колебаний аминогруппы

Действительно, при существенном увеличении концентрации и толщины образца в ИК-спектрах этиламина появляется ряд полос, соответствующих колебаниям аминогруппы (на рис. 3 отмечены стрелками). Большое их число вызвано тем, что при высоких концентрациях наряду

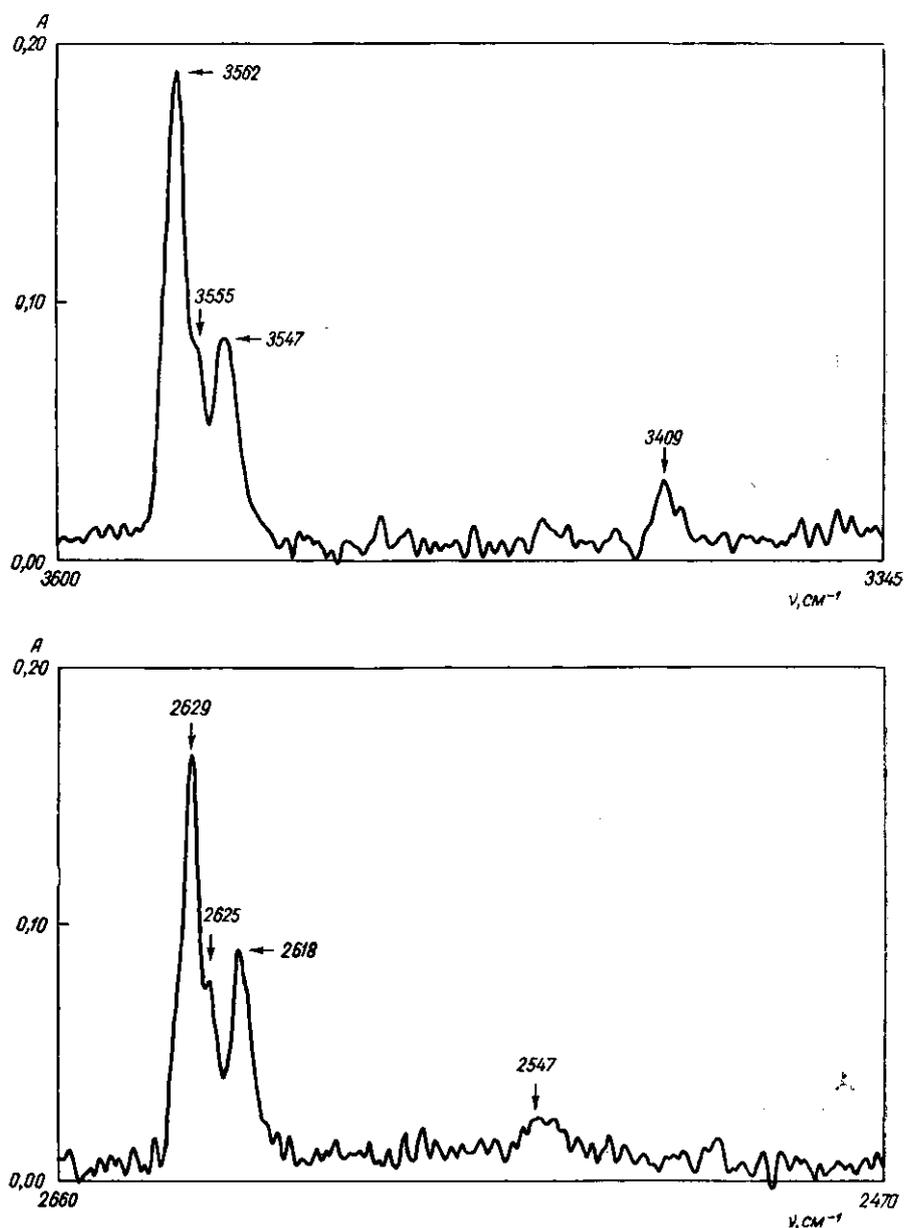


Рис. 4. Область валентных колебаний $\nu(\text{OH})$ глицина (вверху) и $\nu(\text{OD})$ дейтероглицина (внизу)

с полосами поглощения $\nu(\text{NH}_2)$ мономера возникает ряд полос аминогруппы, участвующей в образовании ассоциатов (димеров, тримеров и т. д.). Отметим, что при большом накоплении спектра удалось обнаружить слабое поглощение глицина $\nu(\text{NH}_2)_{\text{асим}} = 3409 \text{ см}^{-1}$ и дейтероглицина $\nu(\text{ND}_2)_{\text{асим}} = 2547 \text{ см}^{-1}$ (рис. 4).

Поскольку при высоком разрешении большинство из наблюдаемых полос ИК-спектров глицина имеет сложную структуру, рассмотрим их подробнее и там, где возможно, проведем предварительный качественный анализ. Как подчеркивалось выше, «расщепление» колебательных

полос в ИК-спектрах аминокислот должно быть связано с проявлением термодинамического равновесия нескольких конформаций в газовой фазе, которое фиксируется в образце в результате быстрого замораживания матрицы. При этом различие положения атомов в конформерах проявляется в изменении взаимного влияния отдельных групп, что не-

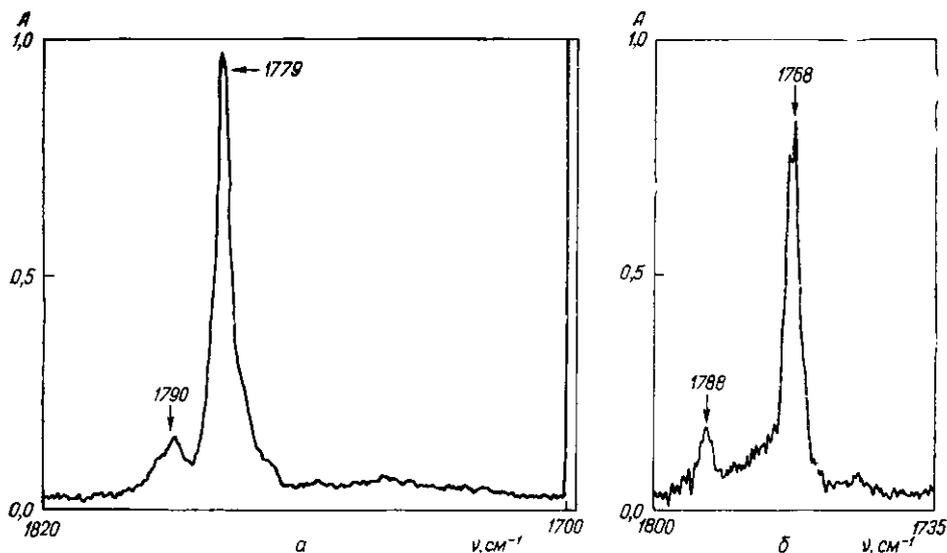


Рис. 5. Область валентных колебаний С=О глицина (вверху) и дейтероглицина (внизу)

сколько меняет их силовые постоянные и форму колебаний и, следовательно, меняются колебательные частоты.

Особый интерес представляет область валентных колебаний ОН-группы глицина. Как видно из рис. 4, в этой области наблюдаются три пика, каждый из которых соответствует своей конформации. Наиболее высокочастотный из них, $\nu(\text{OH}) = 3562 \text{ см}^{-1}$, отвечает свободному колебанию гидроксильной группы, что характерно для глицина в конформации I. В дейтероглицине ему соответствует $\nu(\text{OD}) = 2629 \text{ см}^{-1}$. К конформеру II относятся частоты $\nu(\text{OH}) = 3555$ и $\nu(\text{OD}) = 2625 \text{ см}^{-1}$, сдвиги которых обусловлены внутримолекулярной водородной связью, где ОН- или OD- группа является акцептором протонов аминогруппы. И, наконец, наибольший частотный сдвиг $\nu(\text{OH}) = 3547 \text{ см}^{-1}$, $\nu(\text{OD}) = 2618 \text{ см}^{-1}$ имеет колебание гидроксила, включенного в водородную связь в качестве донора протона (структура III).

Небольшие сдвиги частот свидетельствуют о том, что энергия внутримолекулярных водородных связей с участием гидроксильной и аминогрупп в глицине весьма мала и, по-видимому, сравнима с ван-дер-ваальсовым взаимодействием. Отметим, что коэффициент изотопного сдвига частот ОН-колебаний при дейтерировании одинаков для всех компонент триплета и равен 1,354.

На рис. 5 и 6 приведены другие участки ИК-спектров глицина и дейтероглицина, записанные с высоким разрешением. Видно, что многие из наблюдаемых колебательных переходов являются конформационно-чувствительными. Например, колебание карбонильной группы помимо основной частоты $\nu(\text{C}=\text{O}) = 1779 \text{ см}^{-1}$ имеет также более слабое поглощение на частоте 1790 см^{-1} .

Из сравнения пиковых интенсивностей компонент триплета, отвечающих ОН-колебаниям в различных конформациях, видно, что результаты квантовохимических расчетов [5, 6] находятся в хорошем качественном согласии с выводами настоящего экспериментального исследования. Действительно, наиболее интенсивной и, следовательно, наиболее энергетически выгодной является конформация, в которой гидро-

кисильная группа не участвует в образовании водородных связей, т. е. структура I.

Окончательное заключение об относительной стабильности конформеров глицина можно будет сделать после детальных расчетов изменения интенсивностей ИК-полос для колебаний с участием групп, обра-

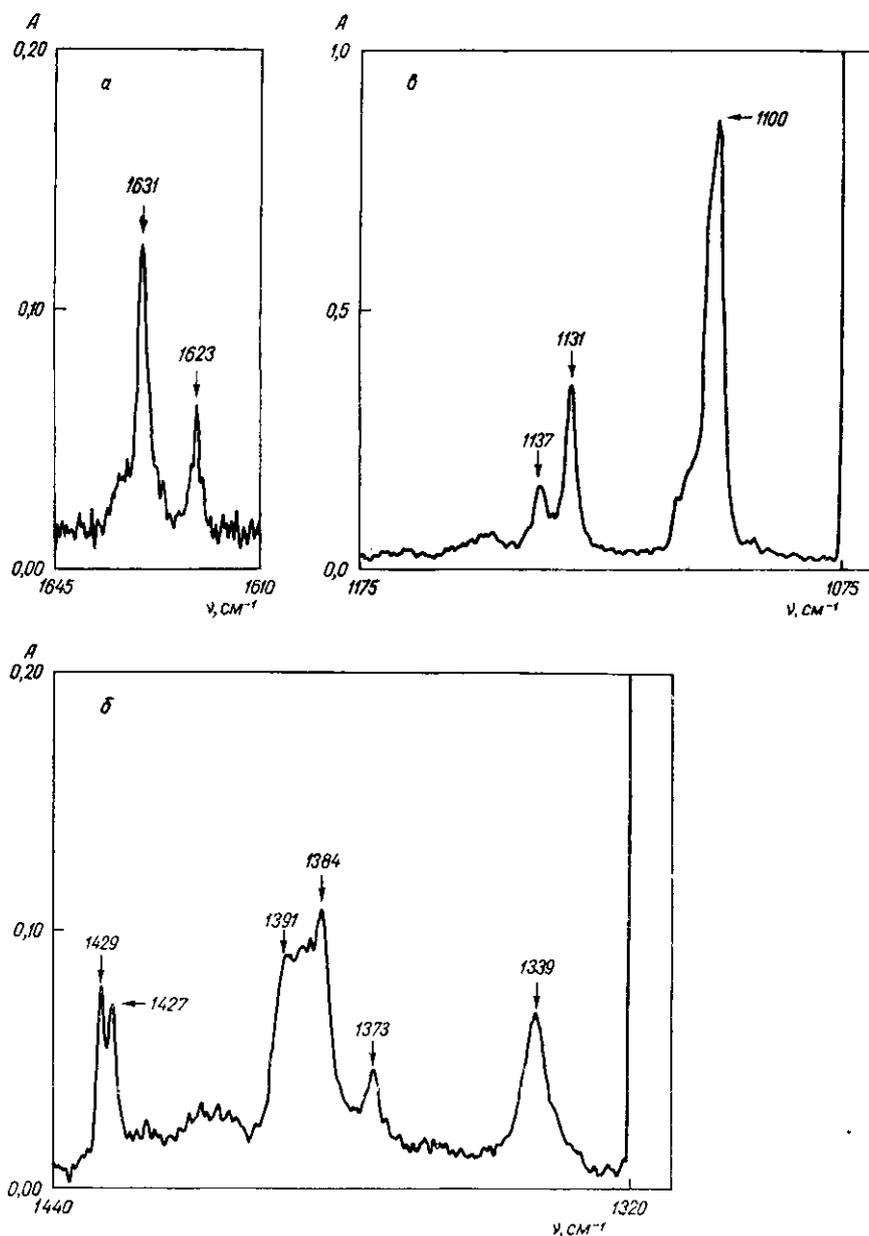


Рис. 6. Детальная структура полос ИК-спектров аминокислот в матрицах Ag, полученных с разрешением $0,8 \text{ см}^{-1}$: а — е — глицин; ж — к — дейтероглицин (см. также с. 70—72).

зующих внутримолекулярные водородные связи. Результаты полного расчетного отнесения наблюдаемых колебательных частот к конкретным конформациям глицина будут опубликованы в ближайшее время.

В заключение авторы выражают благодарность коллегам М. Косевич, И. Галстичу, В. Шелковскому за измерение полевого масс-спектра глицина и полезное обсуждение результатов.

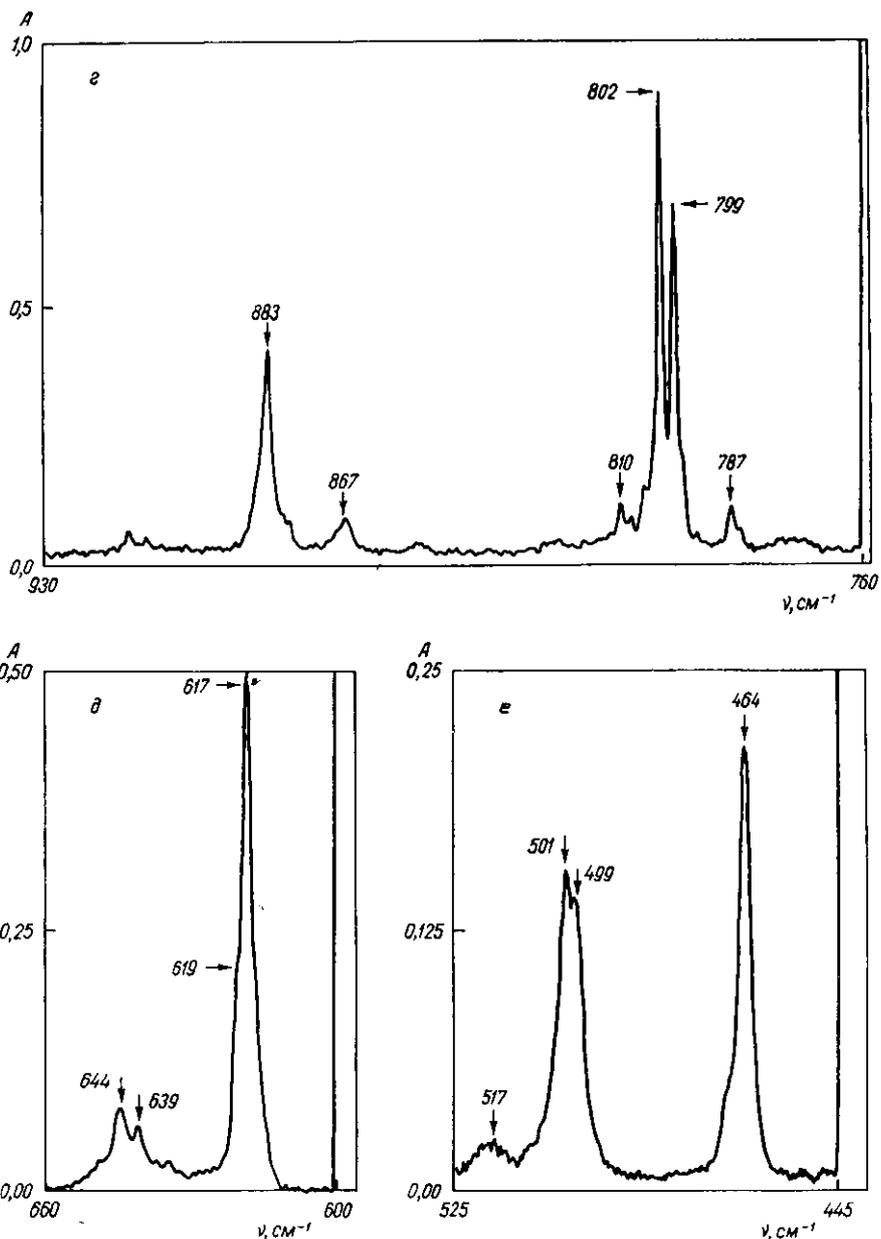


Рис. 6. Продолжение

Резюме. Одержано з високою точністю ІК-спектри гліцину та модельних сполук методом «матричної ізоляції». Проведено емпіричний аналіз спектрів і показано, що при заморожуванні в матрицях амінокислоти переходять із цвїттерїонної у молекулярну форму. Виявлено, що в матрицях існує кілька конформацій, збуджених при температурі випаровування. «Розщеплення» конформаційно-чутливих піків свідчить про наявність в матриці не менш як трьох конформірів гліцину. Зроблено попереднє віднесення конформірів.

Summary. Matrix IR-spectra of glycine and model compounds have been measured. The empirical analysis of the spectra has shown that the glycine molecule transition from zwitterion into uncharged form during the matrix sample preparation take place. Several conformation excited at evaporation temperature appears to present in the cryomatrixes. Splitting of the conformationally sensitive bands indicates that matrix contains at least three different conformers. Preliminary conformer assignments have been carried out.

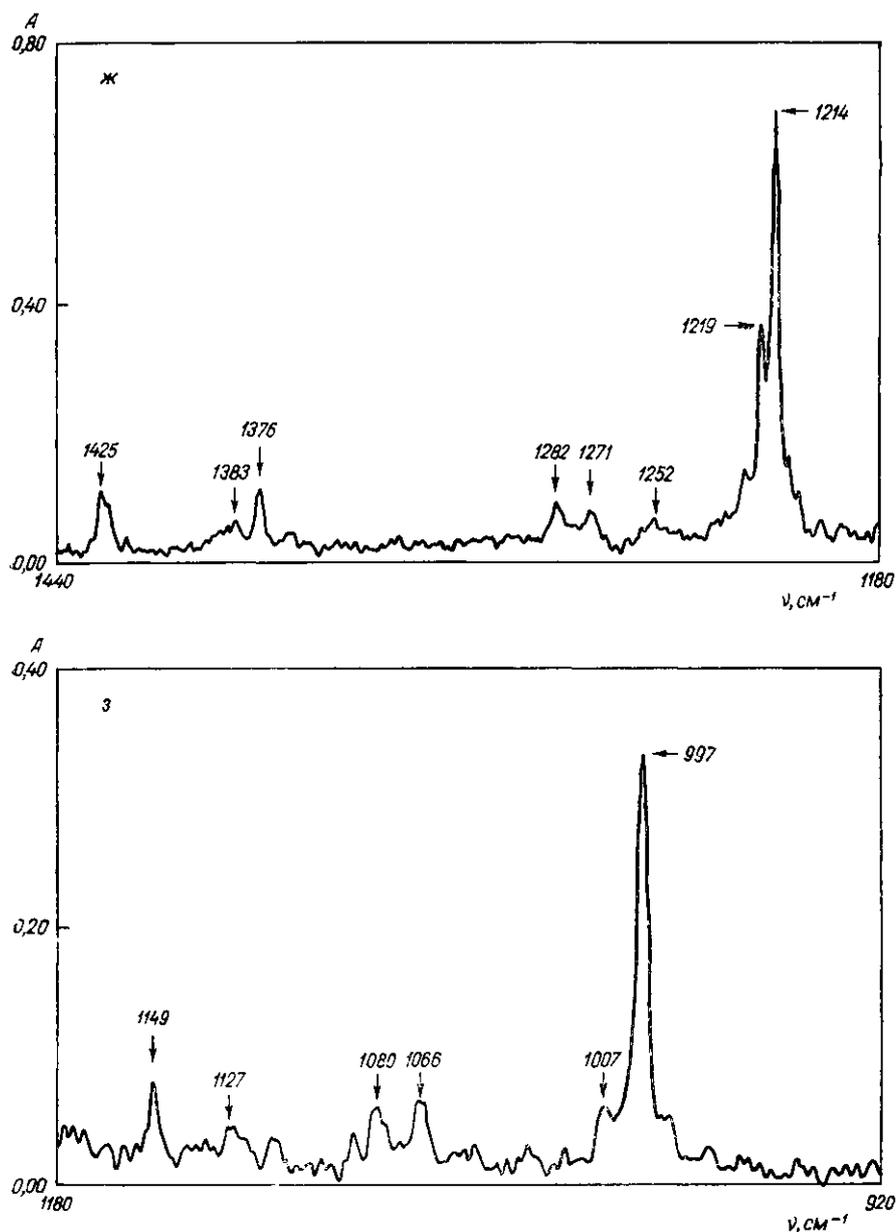


Рис. 6. Продолжение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Imamura A., Fujita H., Nagata C. The electronic structures of glycine in the isolated state and water // Bull. Chem. Soc. Jap.— 1969.— 42, N 11.— P. 3118—3123.
2. Junk G., Svec H. The mass spectra of the α -amino acids // J. Amer. Chem. Soc.— 1963.— 85, N 7.— P. 839—845.
3. The microwave spectrum of glycine / R. D. Brown, P. D. Godfrey, J. W. V. Storey, M. P. Bassez // J. Chem. Soc.— 1978.— P. 547—548.
4. Suenram R. D., Lovas F. J. The microwave study of unionized glycine // J. Mol. Spectrosc.— 1978.— 72.— P. 372—382.
5. Sellers H. L., Schafer L. Investigation, concerning the apparent contradiction between the microwave structure and the *ab initio* calculations of glycine // J. Amer. Chem. Soc.— 1978.— 100, N 24.— P. 7728—7729.
6. Theory versus experiment: the case of glycine / L. Schafer, H. L. Sellers, F. J. Lovas, R. D. Suenram // Ibid.— 1980.— 102, N 21.— P. 6566—6568.
7. Grenie Y., Lasseques J.-C., Garrigou-Lagrange C. Infrared spectrum of matrix-isolated glycine // J. Chem. Phys.— 1970.— 56.— P. 2980—2982.
8. Крейдок С., Хинчклиф А. Матричная изоляция. Метод исследования реакционно-способных неорганических частиц.— М.: Мир, 1978.— 176 с.

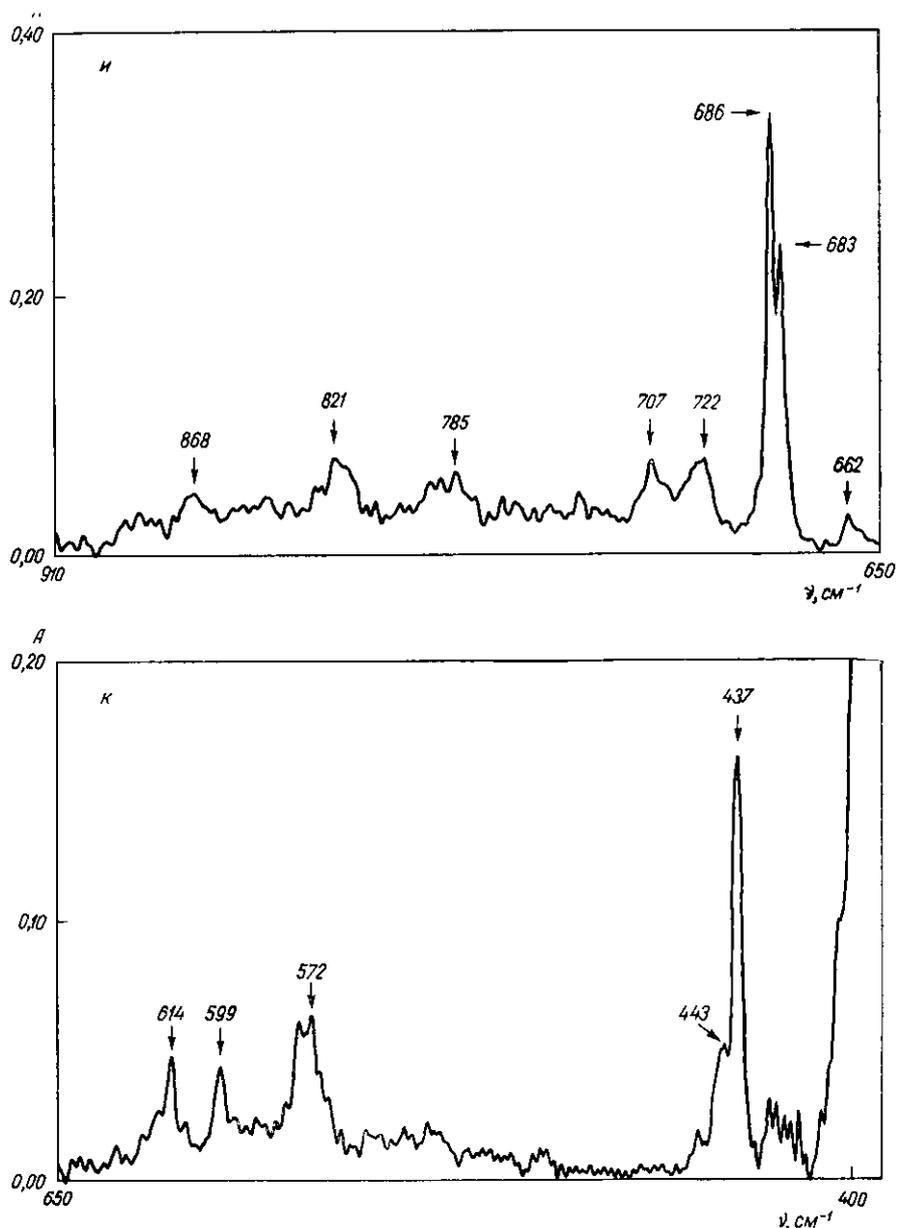


Рис. 6. Окончание

9. *Experimental and theoretical studies of molecular structure features of cytosine* / E. D. Radchenko, G. G. Sheina, N. A. Smorygo, Yu. P. Blagoi // *J. Mol. Struct.*— 1984.— 116.— P. 387—396.
10. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки.— М.: Мир, 1985.— 456 с.
11. *Взаимодействия биомолекул. Новые экспериментальные подходы и методы* / Б. И. Веркин, И. К. Янсон, Л. Ф. Суходуб, А. Б. Теплицкий.— Киев, 1985.— 164 с.
12. *Gray A. P., Lord R. C. Rotation-vibration spectra of methyl amine and its deuterium derivatives* // *J. Chem. Phys.*— 1957.— 26, N 3.— P. 690—705.
13. *Durig J. R., Bush S. F., Baglin F. G. Infrared and Raman investigation of condensed phases of methylamine and its deuterium derivatives* // *Ibid.*— 1968.— 49, N 5.— P. 2106—2117.
14. *Infrared and Raman matrix isolation studies of methylamine* / C. J. Purnell, A. J. Varnes, S. Suzuki et al. // *Chem. Phys.*— 1976.— 12, N 1.— P. 77—87.
15. *Колесательные спектры лейцина* / Г. Г. Шеина, Е. Д. Радченко, А. Ю. Иванов и др. // *Журн. физ. химии.*— 1988.— 62, № 4.— С. 985—990.
16. *Грибов Л. А., Дементьев В. А. Методы и алгоритмы вычислений в теории колебательных спектров многоатомных молекул.*— М.: Наука, 1981.— 308 с.

Физ.-техн. ин-т низких температур АН Украины, Харьков

Получено 04.07.91